

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 670 502**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **90 15602**

(51) Int Cl⁵ : C 12 N 15/81, 1/19/(C 12 N 15/81)(C 12 R 1/865)

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 13.12.90.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 19.06.92 Bulletin 92/25.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : *EUROLYSINE Société Anonyme —*
FR.

(72) Inventeur(s) : Nicolas Alain, Kudla Bernard, Labat
Nathalie et Pardo Daniel.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf
Warcoin Ahner.

(54) Cassette d'intégration « multisite » dans le génome d'une levure, levure transformée et procédé de prépara-
tion d'un produit d'intérêt par une levure ainsi transformée.

(57) l'invention concerne une cassette d'intégration multi-
site dans le génome d'une levure du genre
Saccharomyces, caractérisée en ce qu'elle comporte au
moins:

- une séquence d'intégration présentant de l'homologie
avec une séquence non essentielle naturellement répétée
et dispersée dans le génome de la levure,
- une séquence d'intérêt.

Plus particulièrement, la séquence d'intégration présente
de l'homologie d'une séquence répétée et dispersée Solo
Sigma présente dans le génome de la levure.

Application à la synthèse de produits d'intérêt par la le-
vure.

FR 2 670 502 - A1

BEST AVAILABLE COPY



L'invention a pour objet une cassette d'intégration dans le génome d'une levure, des souches de levure transformées par ladite cassette, et un procédé de préparation de produits d'intérêt par une souche de levure ainsi transformée.

5 On entend par cassette d'intégration toute construction destinée à assurer l'intégration, dans le génome d'une levure, d'une séquence d'intérêt.

Différentes techniques d'intégration dans la levure ont déjà été proposées. Ainsi, HICKS et al (1) ont décrit des événements de transformation d'une levure par un plasmide conduisant par recombinaison homologue
10 entre une séquence présente dans le génome de la levure et une séquence portée par le plasmide, à une intégration dans le génome de la levure d'une séquence qui n'y était pas présente à l'origine.

Les méthodes proposées jusqu'à maintenant fondées sur la recombinaison homologue, ont conduit notamment à l'intégration multicopie en
15 tandem d'une séquence d'intérêt dans le génome de la levure. Cependant, ce type d'intégration peut être instable ce qui définit les limites de la technique envisagée pour augmenter les niveaux d'expression de la séquence d'intérêt malgré des taux de transformation tout à fait satisfaisants.

20 C'est le cas, par exemple de l'intégration de séquences d'intérêt dans les séquences répétées en tandem de l'ADN codant pour les ARN ribosomiques. Ces séquences sont présentes à environ 100 à 200 copies par cellule (2). Or de telles répétitions naturelles sont fréquemment soumises à des événements de recombinaison de type "crossing over" inégal entre les
25 chromatides soeurs tant en méiose qu'en mitose. En outre, des événements d'excision, dus à des recombinaisons intrachromosomiques entre éléments du tandem ont déjà été décrits, notamment par H.C. KLEIN et al. (3). Ce type de réarrangements peut conduire à une dérive génétique de la souche transformée et peut entraîner la perte de la séquence d'intérêt (4).

30 Il y a donc un besoin réel d'une méthode d'intégration dans la levure qui conduise à une intégration à la fois multiple et stable de la séquence d'intérêt dans le génome de la levure, permettant un accroissement sensible du niveau d'expression de la séquence d'intérêt.

Les inventeurs ont maintenant découvert qu'il est possible d'utiliser des séquences naturellement répétées et dispersées du génome d'une levure du genre *Saccharomyces* dont aucune fonction n'est décrite à ce jour. Cette séquence sera appelée "non essentielle" et sera utilisée pour mettre au point une nouvelle méthode d'intégration dans le génome d'une telle levure.

C'est pourquoi l'invention a pour objet une cassette d'intégration dans le génome d'une levure du genre *Saccharomyces*, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins :

- une séquence d'intégration présentant de l'homologie avec une séquence non essentielle naturellement répétée et dispersée dans le génome de la levure,
- une séquence d'intérêt.

Selon un mode de réalisation avantageux de la cassette d'intégration selon l'invention, elle comporte en tant que séquence d'intégration une séquence homologue d'une séquence type Solo LTR, en particulier une séquence Solo LTR, d'une levure du genre *Saccharomyces*, notamment de *S. cerevisiae*.

Les séquences Solo LTR sont issues d'éléments transposables de la levure. Les éléments transposables sont, dans le génome d'un micro-organisme donné, des séquences d'ADN capables de se déplacer d'une position à l'autre. Chez la levure, des éléments transposables identifiés comme rétrotransposons, transposent par un mécanisme qui utilise l'ARN.

Quatre types d'éléments transposables ont été décrits dans la levure. Ils sont désignés par Ty1, Ty2, Ty3 et Ty4.

Chacun de ces éléments est composite et consiste en une région interne de plusieurs kb, flanquée de LTR (Long Terminal Repeat) de plusieurs centaines de paires de bases chacun (figure 1). Les extrémités de ces LTR sont des séquences de répétition inversées, allant jusqu'à 10 pb.

La transposition des Ty se produit par l'intermédiaire d'un ARN transcrit d'un LTR à l'autre et possédant une répétition terminale de 45 pb. Après transcription reverse de cet ARN, l'ADN copié est intégré au génome,

produisant une duplication de 5 pb de la cible chromosomique de part et d'autre du Ty (5). Par recombinaison homologue entre ses LTR, le Ty peut s'exciser et laisse au niveau de son intégration une séquence LTR appelée "Solo LTR", entourée de la duplication de 5 pb. Ces éléments Solo sont à eux seuls incapables de transposer.

Les rétrotransposons Ty1 et Ty2 sont structurellement proches. Ils possèdent un domaine interne epsilon de 5,3 kb et deux séquences flanquantes de répétition directe, appelées éléments delta de 334 à 338 pb. Ils sont présents à raison de 30-35 copies par génome haploïde. Ils se transposent en s'insérant fréquemment dans la région 5' des gènes et en induisant généralement des mutations d'expression (6,7).

Le rétrotransposon Ty3 présente par contre des homologies de séquence limitées avec les séquences de Ty1 et Ty2 (8). On a décrit de 1 à 4 éléments Ty3 par cellule, sans avoir constaté de mutation due à la transposition d'un élément Ty3. Le Ty3 est un élément de 5,4 kb composé d'un domaine interne de 4,7 kb et de séquences LTR de 340 pb appelées séquences Sigma.

Enfin, on a dénombré environ 1 à 4 copies d'éléments Ty4 par cellule. Les séquences flanquantes correspondantes sont appelées éléments Tau.

Le génome de la levure *S. cerevisiae* contient en outre environ 100 copies de séquences Solo Delta non associées avec les éléments Ty1 et Ty2. Ces séquences Solo Delta montrent entre elles des divergences de séquence pouvant aller de 10 à 40% (9). Elles peuvent se rencontrer en groupes de quatre à cinq éléments, et se retrouvent parfois dans les quelques centaines de bases qui précèdent les ARNt (10). Elles résultent probablement de l'excision de la région interne du Ty par recombinaison homologue entre ses deux séquences Delta flanquantes.

De la même façon, on trouve dans le génome de *S. cerevisiae* des séquences Solo Sigma ou Tau.

Ces séquences Solo LTR sont particulièrement intéressantes comme séquences d'intégration dans la mesure où elles ne présentent aucune

fonction essentielle pour la levure du genre *Saccharomyces*; par ailleurs, elles possèdent une stabilité naturelle dont peut bénéficier la séquence intégrée. Sans lier les résultats observés par la mise en oeuvre de l'invention à des hypothèses théoriques, on peut rappeler ici qu'il apparaît
5 désormais vraisemblable que des mécanismes cellulaires contrôlent la recombinaison, et donc la stabilité de ces séquences naturellement répétées. Ces mécanismes impliqueraient par exemple des topoisomérases spécifiques.

Suivant une forme de réalisation avantageuse de la cassette
10 d'expression selon l'invention, elle comprend une séquence d'intégration homologue d'une séquence Solo Sigma.

Selon les souches de levure étudiées, on compte environ 30 copies de séquences Solo Sigma. Elles présentent entre elles une forte conservation de séquence puisque le maximum de divergence constaté entre deux
15 séquences est de 2,5% (11). A la différence des Solo Delta, les Solo Sigma présentent une étroite association avec le ARN de transfert (ARNt). En particulier, elles sont toujours situées à une distance de 16 à 19 pb en 5' du point d'initiation de transcription d'un ARNt et aucune interaction entre l'élément Sigma et l'expression de l'ARNt ne semble se produire.

20 Le fait que les Solo Sigma présentent une forte homologie de séquence entre elles, doit permettre, par l'utilisation d'un Solo Sigma donné, de cibler les constructions pour l'intégration dans les autres Solo Sigma de façon équivalente.

Il devient ainsi possible, avec une seule étape de transformation de
25 prévoir l'intégration d'une séquence d'intérêt à différents loci dispersés dans le génome de la levure, et correspondant à différentes séquences Solo Sigma.

D'autre part, leur localisation stricte, c'est-à-dire toujours à une distance de 16 à 19 pb en 5' de gènes codant pour différents ARNt permet
30 de prévoir l'environnement chromosomique des séquences d'intérêt intégrées à leur niveau.

Enfin et surtout, leur étroite association avec les ARNt exprimés suggère qu'il est possible de maintenir un Solo Sigma au voisinage direct

d'une séquence fortement transcrite. Ainsi, une séquence d'intérêt introduite à ce niveau, à proximité d'un gène essentiel, bénéficiera probablement d'une forte sélection contre tout événement majeur de remaniement qui affecterait l'expression de l'ARNt.

5 On citera plus particulièrement la séquence Solo Sigma localisée sur le chromosome VIII de *S. cerevisiae* à proximité du gène ARG4.

Pour préparer la cassette d'intégration, on peut partir d'une séquence Solo LTR localisée sur un chromosome de la levure à transformer, et modifier cette séquence en utilisant des techniques connues de l'homme du
10 métier pour produire un fragment d'ADN comportant une séquence d'intérêt et apte à transformer une levure du genre *Saccharomyces*.

Ces modifications doivent permettre :

- (i) de sous-cloner et d'isoler la séquence Solo LTR à l'exclusion de toute autre séquence chromosomique,
- 15 (ii) de cloner une séquence d'intérêt à l'intérieur de cette séquence Solo LTR,
- (iii) par simple restriction, d'isoler un fragment d'ADN comportant une séquence Solo LTR interrompue par toute séquence d'intérêt à l'exclusion de toute séquence bactérienne.

20 Pour permettre sa sélection et son amplification dans les souches bactériennes, on associe au fragment d'ADN ainsi préparé des fragments d'ADN bactérien comportant en particulier une origine de répllication bactérienne et un gène de sélection, par exemple un gène de résistance à un antibiotique.

25 D'une manière générale, la séquence d'intérêt peut coder pour tout produit d'intérêt : protéine, enzyme ou autre. Elle peut être hétérologue ou homologue, suivant que l'on désire faire produire à la levure un produit qu'elle ne produit pas naturellement, ou encore accroître le niveau d'expression d'un produit fabriqué naturellement par la levure.

30 C'est pourquoi l'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un produit d'intérêt par une levure du genre *Saccharomyces* par transformation d'une levure avec une cassette d'intégration selon l'invention.

Bien évidemment, il est également possible de faire comporter à la cassette d'intégration selon l'invention plusieurs séquences d'intérêt de façon à permettre l'intégration puis l'expression de plusieurs séquences. Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux lorsqu'on souhaite
5 faire produire simultanément à une levure plusieurs protéines utiles, ou encore plusieurs enzymes codés par des gènes d'une voie de biosynthèse pour la préparation d'un métabolite particulier.

Suivant un autre mode de réalisation de l'invention, on utilise la cassette d'intégration selon l'invention pour faire des intégrations
10 séquentielles de diverses séquences d'intérêt dans le génome de la levure. En particulier, comme dans le cas précédent, cette méthode peut être utile pour l'intégration de plusieurs gènes d'une voie de biosynthèse d'un métabolite particulier.

C'est pourquoi l'invention a également pour objet un procédé de
15 préparation de plusieurs produits d'intérêt, par une levure du genre *Saccharomyces* selon lequel :

- on transforme successivement une levure du genre *Saccharomyces* avec des cassettes d'intégration selon l'invention, comportant chacune en tant que séquence d'intérêt une séquence d'ADN codant pour l'un des produits
20 d'intérêt, ou
- on transforme une levure du genre *Saccharomyces* avec une cassette d'intégration selon l'invention comportant plusieurs séquences d'intérêt codant chacune pour l'un des produits d'intérêt.
- on met en culture la souche de levure ainsi transformée, et
25 - on récupère ledit métabolite.

Pour la mise en oeuvre de l'invention, la séquence d'intérêt est de préférence clonée à l'intérieur de la séquence d'intégration.

L'invention concerne également une souche de levure transformée par une cassette d'intégration selon l'invention. Plus particulièrement, elle
30 a pour objet une souche de levure du genre *Saccharomyces* qui contient dans son génome au moins une séquence d'intérêt intégrée en une seule

copie dans au moins une séquence non essentielle naturellement répétée, et dispersée dans son génome. Il s'agit notamment d'une souche de *S.cerevisiae* pour laquelle ladite séquence naturellement répétée et dispersée dans son génome est une séquence Solo Sigma.

- 5 La transformation des levures par la cassette d'intégration selon l'invention peut se faire par différentes méthodes, notamment par électroporation.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront au cours de la description détaillée suivante d'exemples de réalisation, accompagnés des figures 1 à 17, qui montrent :

- 10 - Figure 1 : la structure générale d'un rétrotransposon Ty de levure.
- Figure 2 : la carte physique de la région chromosomique autour des séquences Solo Sigma portées par le chromosome VIII de *S. cerevisiae*, à proximité du gène ARG4.
- 15 - Figure 3 : la séquence nucléotidique de la région du chromosome VIII de *S.cerevisiae* située à 4 kb en 5' du gène ARG4. Sous la séquence sont indiquées les différences constatées avec la séquence Solo Sigma la plus fréquemment obtenue.
- 20 - Figure 4 : l'analyse par autoradiographie du contenu en séquences Solo Sigma des souches de *S.cerevisiae*, OLI, MGD131 102A et YNN295.
- 25 - Figure 5 : les différentes étapes conduisant par mutagenèse dirigée à l'introduction, de part et d'autre des séquences répétées inversées qui bordent l'élément Sigma VIII.1, de sites de restriction permettant le clonage précis de la séquence Sigma à l'exclusion de toute autre séquence chromosomique.
- 30 - Figure 6 : les différents oligonucléotides nécessaires pour introduire, par une technique de mutagenèse par PCR, des sites de restriction au centre de la séquence Sigma clonée dans le plasmide pBK605, pour permettre le clonage d'une séquence d'intérêt à cette position.
- Figure 7 : la structure des plasmides pBK609, pBK610 et pBK614.
- Figure 8 : la séquence nucléotidique du fragment ClaI-HinDIII du plasmide pBK610.

- Figure 9 : la structure du plasmide pBK617.
- Figure 10 : la structure des plasmides pBK611, pBK615 et pBK616.
- Figure 11 : une autoradiographie des chromosomes des transformants
ORT786.1 à ORT786.9 par une sonde spécifique URA3.
- 5 - Figure 12 : une autoradiographie des chromosomes des transformants
ORT731 à ORT740 par une sonde spécifique URA3.
- Figure 13 : une autoradiographie des chromosomes des transformants
ORT720 à ORT730 par une sonde spécifique ARG4.
- Figure 14 : figure 14a) : la structure et les séquences bordantes du
10 fragment SmaI-HinDIII du plasmide pBK611.
figure 14b) : l'analyse par Southern des transformants ARG⁺
obtenus.
- Figure 15 : la technique utilisée pour déterminer les modalités d'inté-
gration appelée amplification par PCR inverse, ainsi que les
15 séquences génomiques des transformants ORT724 et ORT723.
- Figure 16 : l'analyse par autoradiographie des chromosomes de différents
surtransformants ARG⁺ URA⁺ à l'aide d'une sonde spécifique
URA3 et ARG4 (surtransformants ORT720.6, 720.7, 720.8)
- 20 - Figure 17 : la même analyse qu'à la figure 16, sauf qu'elle concerne les
surtransformants ORT723.8, 723.9.
- Figure 18 : la même analyse qu'aux figures 16 et 17, sauf qu'elle
concerne les cotransformants ORT742, 745, 769.2, 769.8.

25 EXEMPLE 1

**Clonage et caractérisation d'un élément Sigma porté par le chromosome
VIII de *S. cerevisiae*, à proximité du gène ARG4**

- Il fut détecté par hybridation à l'aide d'une séquence spécifique
isolée à partir d'une séquence Sigma connue (11), puis l'existence d'un site
30 de restriction XhoI caractéristique de l'élément Sigma a permis de préciser
sa localisation à 4 kb en 5' du gène ARG4.

La carte de restriction de la région chromosomique correspondante est donnée à la figure 2.

On utilise le fragment de restriction BamHI-PstI provenant du plasmide p(spo13)2 (12) de 4 kb contenant l'élément Sigma (figure 2) pour
5 générer différents fragments de restriction : XhoI-BglII (0,8 kb), BglII-XhoI (1,7 kb) et BglII-EcoRI (2,1 kb). Ces fragments sont ensuite sous-clonés chacun dans un vecteur de type BluescriptKS⁻ (Stratagène) pour donner respectivement les plasmides pBL1, pBL4 et pBL6.

Ces différents plasmides permettent d'obtenir de l'ADN simple brin
10 et sont séquencés par la technique de Sanger à partir de l'oligonucléotide amorce T3.

La séquence nucléotidique de la zone du chromosome VIII au voisinage du gène ARG4 obtenue est présentée à la figure 3.

Cette séquence nucléotidique présente au niveau du site XhoI
15 considéré, de la position 258 à la position 598, les 341 paires de base correspondant aux séquences classiques d'un élément Sigma. Ce fragment sera ultérieurement utilisé pour diriger l'intégration. En particulier, on note de la position 258 à 265 et de la position 591 à 598 les séquences répétées inversées TGTTGTAT et ATACAACA qui correspondent aux bornes
20 caractéristiques de cet élément.

De plus, l'élément est bordé par la duplication de la séquence GAATG répétée en orientation directe. Cette séquence GAATG n'est pas spécifique de l'élément Sigma, mais spécifique du locus d'intégration. Cette duplication de 5bp de part et d'autre d'un élément Sigma est le signe de
25 l'excision du TYIII par recombinaison intramoléculaire entre ses LTR Sigma. Nous avons donc à ce locus un élément "Solo Sigma". Par ailleurs, on trouve de la position 241 à 169 les séquences d'un gène d'ARN de transfert. Il s'agit du gène codant pour l'ARNt Ala, isoaccepteur majoritaire reconnaissant le codon AGC. On constate que l'élément Sigma se trouve 16
30 paires de bases en 5' du point d'initiation de transcription de cet ARNt.

Dans la suite de la description, chaque élément Sigma identifié est désigné par SigmaXXX.xx, où XXX en chiffre romain spécifie le numéro du chromosome portant le Sigma et xx en chiffre arabe spécifie le Sigma sur un chromosome donné. Par exemple, la séquence obtenue provient du

5 SIGMAVIII.1.

En comparant la séquence de ce SIGMAVIII.1 avec celles des différents Sigma clonés aléatoirement par Sandmeyer (11), on observe une correspondance avec le clone n° 7 de Sandmeyer. On constate en outre que SIGMAVIII.1 présente 9 singularités de séquence par rapport à la séquence

10 majoritairement obtenue par Sandmeyer (ces singularités de séquence sont signalées par l'indication sous la séquence des bases correspondantes de Sandmeyer - figure 3). Cette divergence représente 9 nucléotides sur 341, soit 2,6%.

15 EXEMPLE 2

Caractérisation du contenu en séquences Sigma du génome de Saccharomyces cerevisiae

On étudie les souches de Saccharomyces cerevisiae OLI, MGD131

20 102A utilisées ultérieurement comme réceptrices de transformation.

Ces souches présentent les génotypes suivants :

OLI : Mat Δ , his3-(11,15), leu2-(3,112), ura3-(257,373), gal2.

MGD131 102 A : Mat a, his3-1, ade2, arg4- Δ 2060, ura3-52, trp1-289.

L'analyse de ces souches est effectuée en séparant les chromosomes par

25 électrophorèse en champs pulsés (CHEF DR II, Bio-Rad), puis les chromosomes une fois séparés sont transférés sur membrane de nylon Hybond N⁺ (Amersham). Le filtre obtenu est hybridé à l'aide du fragment

30 ClaI-HindIII provenant du plasmide pBK605 et marqué au ³²P par "Random Priming". Ce fragment porte uniquement les séquences SIGMAVIII.1 (figure 6).

La construction du plasmide pBK605 est décrite de façon détaillée à l'exemple 3.

On constate sur les autoradiographies présentées à la figure 4 que dans la souche OLI comme dans la souche MGD131 102A, les trois chromosomes VI, X et XIII sont dépourvus d'éléments Sigma, que les chromosomes I, III, IX, XI et II semblent ne porter qu'un élément, et que les autres chromosomes en portent plusieurs. On constate que le chromosome VIII, à partir duquel VIII.1 a été isolé, semble porter plusieurs éléments.

On constate que dans la souche de *S. cerevisiae* YNN295 (BioRad), utilisée comme marqueur de migration chromosomique, le contenu en Sigma diffère de celui obtenu avec les souches OLI et MGD131 102A. Le résultat peut varier d'une souche à l'autre tant pour les chromosomes qui portent des Sigma que pour le nombre de Sigma présents par chromosome.

Enfin, le résultat obtenu montre que le SIGMAVIII.1 choisi permet d'hybrider un nombre d'éléments estimés à une trentaine par génome haploïde. Il devrait donc permettre de diriger l'intégration d'une séquence d'intérêt dans les autres Solo Sigma.

EXEMPLE 3

20 Construction des vecteurs intégratifs pBK610 et pBK614

1 - MUTAGENES DIRIGES DU SIGMAVIII.1

La première mutagenèse consiste à introduire de part et d'autre des séquences répétées inversées qui bordent l'élément SIGMAVIII.1 des sites de restriction permettant le clonage précis de cet élément à l'exclusion de toute autre séquence chromosomique.

Pour ce faire, on effectue l'amplification des séquences de SIGMAVIII.1 par P.C.R. (Polymerase Chain Reaction) en utilisant les oligonucléotides amorce mutagènes A et B détaillés à la figure 5. La construction initiale utilisée pour cette mutagenèse est le plasmide pBL6 porteur du fragment chromosomique BglII-EcoRI de 2,1 kb contenant le SIGMAVIII.1.

L'amplification conduit à la synthèse du fragment d'ADN compris entre les deux oligonucléotides amorce utilisés. L'incorporation physique des oligonucléotides A et B lors de cette synthèse conduit à la création de sites SpeI, EagI, ClaI directement en 5' des séquences Sigma et de sites HinDIII, Sall et XbaI directement en 3' desdites séquences.

Le mélange réactionnel (100µl) pour la réaction PCR comprend :

- 53 µl d'eau désionisée et stérile
- 10 µl de tampon 10x : 0,5M KCL
 - 0,1M Tris-Cl pH8,3
 - 15 mM MgC₂(2)
 - 0,1% (m/v) gélatine
- 16 µl des quatre dNTPs (1,25 mM de chaque)
- 5 µl de l'oligonucléotide A (20 µM)
- 5 µl de l'oligonucléotide B (20 µM)
- 10 µl du plasmide pBL6 (50 ng)

Le mélange est incubé à 100°C pendant 3 minutes, puis refroidi dans la glace. On ajoute ensuite 1 µl (5 U) de l'ADN Taq polymérase thermostable au mélange. Celui-ci est ensuite recouvert de 200 µl d'huile minérale.

On effectue la réaction d'amplification dans un Cycleur thermique à ADN de Perkin Elmer Cetus pendant 25 cycles, un cycle comprenant :

- une étape de dénaturation de l'ADN pendant 2 minutes à 94°C
- une étape d'hybridation pendant 2 minutes à 37°C
- une étape de polymérisation pendant 2 minutes à 72°C.

Après 25 cycles, on effectue une étape de polymérisation de 20 minutes à 72°C afin de terminer les synthèses interrompues.

On sépare une partie du produit de l'amplification (20 µl) par électrophorèse en gel d'agarose. Le fragment d'ADN de 350 bp obtenu est ensuite purifié par adsorption sur billes de verre, repris en TE et restreint par les enzymes SpeI et Sall.

Ce fragment restreint est ensuite cloné dans un vecteur M13mp18 ouvert par les enzymes XbaI et Sall pour donner le plasmide pBK605 (voir figure 6).

La seconde mutagénèse entreprise a pour but de créer des sites de restriction au centre de l'élément Sigma de façon à permettre le clonage de séquences d'intérêt à cette position.

5 Pour ce faire, on effectue deux amplifications P.C.R. indépendamment à partir du plasmide pBK605 (figure 6).

La première de ces amplifications comporte un oligonucléotide mutagène SigB central à l'élément Sigma et un oligonucléotide non mutagène REV situé dans le vecteur en amont du Sigma.

10 La seconde amplification est réalisée avec l'oligonucléotide mutagène SigA complémentaire de SigB et un oligonucléotide non mutagène UN situé dans le vecteur en aval du Sigma.

La structure des oligonucléotides SigA et SigB est donnée à la figure 6.

15 De la sorte, les deux moitiés de l'élément Sigma sont synthétisées avec pour chacune d'elles deux nouveaux sites : BalI ou EaeI et StuI.

Les produits de ces deux synthèses sont purifiés sur gel d'agarose.

20 Le fragment d'ADN obtenu lors de la première amplification est restreint par les enzymes SmaI et StuI puis cloné dans un Bluescript Ks⁺ ouvert par l'enzyme SmaI pour donner le plasmide pBK609 (figure 7).

Le fragment d'ADN obtenu lors de la seconde amplification est restreint par les enzymes SalI et StuI. Ce fragment est ensuite cloné dans le plasmide pBK609 d'abord ouvert par l'enzyme HinDIII et traité par la Polymérase I fragment de Klenow, puis restreint par l'enzyme SalI.

25 Le plasmide résultant, pBK610 est présenté à la figure 7.

Le fragment de restriction ClaI-ClaI obtenu du plasmide pBK610 est introduit au site ClaI d'un plasmide dérivé du Bluescript KS⁺ dépourvu des sites SmaI, PstI, EcoRI et EcoRV.

Le plasmide pBK614 ainsi obtenu est présenté à la figure 7.

30 Dans ce dernier plasmide, les duplications des sites BamHI et EagI sont supprimées, et l'élément Sigma est maintenant directement encadré de sites HinDIII et ClaI.

Le fragment ClaI - HinDIII du plasmide pBK610 a été séquencé et la séquence est présentée en figure 8.

L'analyse de cette séquence montre que l'élément Sigma muté est maintenant directement bordé de sites de restriction et qu'il possède en son milieu quatre sites uniques :

BalI ou EaeI, PstI, EcoRI et EcoRV.

5 Il faut noter que les 38 nucléotides porteurs de ces sites de restriction, soit la séquence :

CCAAAGAGGGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTCCT

sont introduits en lieu et place des 12 nucléotides centraux TGGAAGCGGA du SIGMAVIII.1.

10 Ces nucléotides hétérologues sont représentés en italiques dans la figure 8.

L'élément Sigma muté résultant est appelé SIGMAVIII.1*.

EXEMPLE 4

15 Construction d'un vecteur intégratif contenant le gène URA3 de S. cerevisiae

L'ADN du fragment de restriction EcoRI-NsiI (1,1 kb) contenant le gène URA3 (13) est purifié et introduit dans le plasmide pBK614 ouvert par les enzymes EcoRI et PstI.

Le plasmide pBK617 résultant est présenté à la figure 9.

EXEMPLE 5

25 Construction de vecteurs intégratifs contenant le gène ARG4 de S. cerevisiae

L'ADN du fragment HpaI-HpaI de 2060 pb du génome de S. cerevisiae contenant l'unité transcriptionnelle ARG4 (figure 2) est cloné au site SmaI du polylinker des plasmides pUC18 et pUC19. Les fragments EcoRI-PstI (2,1 kb) des plasmides résultant de ces clonages sont purifiés et insérés dans les plasmides pBK610 et pBK614 ouverts par les enzymes EcoRI et PstI. Les plasmides pBK611, pBK615 et pBK616 résultants de ces constructions sont présentés à la figure 10.

EXEMPLE 6

Transformation de la souche OLI par le fragment Sigma::URA3
(SIGMAVIII.1* interrompu par le gène URA3)

5 La souche réceptrice OLI, porteuse de la mutation *ura3*-(257,373) est transformée par électroporation (Bio-Rad GenePulser) avec le fragment HindIII-HindIII de 1,4 kb (Sigma::URA3), purifié d'un gel d'agarose après la digestion du plasmide pBK617.

Pour ce faire, 80 ml d'une culture en YPD parvenue à 2×10^7
10 cellules/ml sont centrifugés 5 minutes à 3500 tpm. Le culot cellulaire est repris en 8 ml de Dithiothréitol 25 mM.

Les cellules sont gardées à température ambiante 20 à 25 minutes puis recentrifugées.

Le culot est repris en 800 μ l (soit 10^9 cellules/ml) en tampon
15 d'électroporation :

- Sucrose 270 mM
- Tris-Cl 10 mM pH8
- $MgCl_2$ 0,1 mM

Dans une cuvette d'électroporation de 2 mm on place :

- 20
- 100 μ l de cellules (10^8 cellules)
 - 10 μ l du fragment purifié (de 100 à 500 ng)
 - 1 μ l d'ADN entraîneur (10 μ g d'ADN de thymus de veau soniqué).

La cuvette est placée dans la chambre d'électroporation et est soumise à une décharge électrique selon les conditions :

- 25
- voltage 450 V/cm
 - capacitance 250 μ F
 - dérivation 200 Ω .

On ajoute immédiatement après le choc 400 μ l d'eau stérile à température ambiante dans la cuvette afin de refroidir le mélange. De 100
30 à 500 μ l du mélange sont ensuite étalés sur milieu sélectif et les cellules sont laissées 48 h à 30°C.

De la sorte, de 300 à 600 transformants URA^+ sont obtenus par microgramme de fragment linéaire sur milieu sélectif sans uracile.

L'analyse de 9 transformants $URA3^+$ (désignés ORT 786.1 à 786.9)

choisis au hasard, est réalisée par séparation de chromosomes, transfert et hybridation du filtre obtenu à l'aide d'une sonde spécifique constituée du fragment HindIII-HindIII du gène URA3 (13).

Le résultat de cette hybridation est présentée sur la figure 11.

5 On constate que sur cette autoradiographie tous les transformants analysés présentent un signal au niveau du chromosome V, porteur des séquences mutantes *ura3*-(257,373), comme cela est observé pour la souche réceptrice OL1. D'autre part, les transformants ORT786.1, .2, .4, .6, .8 et .9
10 portent une copie additionnelle de la séquence URA3 dispersée respectivement aux chromosomes XV ou VII, XIV, II, IX, XV ou VII. Pour les transformants ORT786.3, .5, .7 aucune bande additionnelle n'est visible. Ceci peut s'expliquer soit par une conversion génique de l'allèle mutant *ura3*-(257,373) vers la forme sauvage, soit par l'intégration d'une copie additionnelle de la séquence URA3 au chromosome V ou VIII.

15

EXEMPLE 7

Transformation de la souche MGD131 102A par le fragment Σ URA3 (Σ VIII.I* interrompu par le gène URA3).

20 Afin de pouvoir généraliser les résultats décrits précédemment, l'étude a été poursuivie dans une autre souche modèle MGD131 102A.

Cette souche, présentant la mutation *ura3*-52, a été transformée comme précédemment par électroporation à l'aide du fragment purifié HindIII-HindIII de 1,4 kb (Σ URA3) issu de la restriction du plasmide pBK617. Les transformants URA⁺ obtenus (de 150 à 350 par μ g d'ADN) sont
25 sélectionnés sur milieu sans uracile.

L'analyse de 10 transformants URA⁺ (désignés par ORT731 à ORT740), choisis au hasard, est réalisée par séparation de chromosomes, transfert et hybridation du filtre obtenu à l'aide d'une sonde spécifique URA3 (figure 12).

30 On observe l'intégration d'une copie additionnelle URA3 dans tous les transformants analysés et ceci à différents chromosomes selon les transformants, soit au chromosome VIII pour ORT733, 736 et 738, soit au chromosome XVI pour ORT735, soit au chromosome XV pour ORT732, 736, 737 et 739 et soit au chromosome XII pour ORT734.

Dans chaque transformant on révèle en plus la copie du gène muté *ura3-52* située au chromosome V.

5 Ce résultat montre que le système utilisé "un gène dans un élément Sigma" permet de disperser une séquence d'intérêt dans le génome d'une deuxième souche et démontre que l'invention est potentiellement utilisable dans toute souche porteuse d'éléments Solo Sigma répétés et dispersés.

EXEMPLE 8

10 Transformations de la souche MGD131 102A par le fragment Sigma::ARG4 (SigmaVIII.I* interrompu par le gène ARG4)

Afin de généraliser l'utilisation de l'invention de la cassette d'intégration multisite à une autre séquence d'intérêt, la souche réceptrice MGD131 102A porteuse de la mutation *arg4-Δ2060* est transformée comme précédemment par électroporation à l'aide du fragment de restriction 15 SmaI-HindIII de 2,5 kb (Sigma::ARG4) provenant de la digestion du plasmide pBK611, voir figure 10.

De 150 à 1 200 transformants par µg de fragment sont obtenus sur milieu sélectif sans arginine.

20 L'analyse de 10 transformants ARG⁺ (désignés par ORT720 à ORT729), choisis au hasard, est réalisée par séparation de chromosomes, transfert et hybridation du filtre obtenu à l'aide d'une sonde spécifique ARG4.

25 La sonde utilisée est le fragment HpaI-HpaI de 2060 pb qui contient l'unité transcriptionnelle ARG4 (figure 2) et qui correspond exactement à la délétion Δ2060 de la souche réceptrice. De la sorte, ne sont révélées par hybridation que les copies du gène introduites lors de la transformation.

Le résultat de cette hybridation est présenté à la figure 13.

Sur cette autoradiographie on constate plusieurs faits :

30 - le gène ARG4 est présent sur différents chromosomes selon les transformants (IX pour ORT720; VIII pour ORT721, 724 et 728; II pour ORT722, 723 et 730; XV ou VII pour ORT725; XII ou IV pour ORT726 et 729).

- l'intensité du signal d'hybridation obtenu est variable : plus importante pour ORT722 et 723, faible pour ORT729 bien que ce transformant soit phénotypiquement ARG⁺.

5 Afin de préciser la structure et le nombre de copies intégrées du fragment Sigma::ARG4, l'ADN total des transformants ORT720, 722 et 724 est extrait et analysé par Southern par une simple restriction ClaI, BglII et BamHI et par une double restriction XhoI+NdeI (figure 14).

La sonde utilisée est le fragment HpaI-HpaI de 2060 pb, spécifique du gène ARG4.

10 Tous les transformants analysés présentent une bande unique XhoI-NdeI de 2,45 kb, comme attendu par la digestion XhoI-NdeI du plasmide pBK611.

L'analyse des résultats obtenus pour ORT724 (deux bande de 2,35 et 2,75kb avec BglII et une bande de 4,45 kb avec BamHI) sont compatibles
15 avec l'existence d'une intégration en copie unique du gène ARG4 dans le Sigma VIII.1 de départ (voir la carte de restriction de cette région figure 2). Les profils de restriction BglII et BamHI des transformants ORT720 et 722 similaires à celui de ORT724 tendent à montrer qu'une intégration en copie unique du gène ARG4 s'est produite dans ces transformants.

20 Les résultats obtenus montrent que le système utilisé "un gène dans un élément Sigma" permet de disperser dans le génome un second type de séquence d'intérêt.

Afin de déterminer précisément les modalités d'intégration de deux des transformants obtenus (ORT723 et ORT724), l'ADN bordant chaque
25 insertion du côté du site XhoI est amplifié par une méthode dite "inverse P.C.R.", puis le fragment amplifié obtenu est séquencé. L'obtention d'un fragment d'amplification unique pour ces deux transformants suggère l'intégration d'une seule copie dans le génome.

La technique d'amplification et les séquences obtenues sont
30 présentées à la figure 15.

Pour ORT724, dont le fragment Sigma::ARG4 est intégré au chromosome VIII, la séquence lue révèle que :

- tous les nucléosides spécifiques du SIGMAVIII.1 de la position 347 à la position 258 sont retrouvés.

- tous les nucléotides hétérologues localisés en 5' du site XhoI initialement présents dans le fragment SmaI-HinDIII sont délévés, en particulier la séquence correspondant au site de restriction ClaI (figure 15).

De plus, les 180 pb adjacentes à l'élément Sigma::ARG4 intégré
5 correspondent exactement à celles initialement décrites pour la région flanquante du SIGMAVIII.1 de la position 77 à la position 257. Ces 180 pb couvrent le tARN Ala associé au SIGMAVIII.1 (figure 3).

Ceci démontre que l'intégration du fragment Sigma::ARG4 s'est bien produit dans le transformant ORT724 par recombinaison homologue avec le
10 SIGMAVII.1 de départ.

Pour le transformant ORT723, dont le fragment Sigma::ARG4 est intégré dans le chromosome II, la séquence montre que :

- les nucléotides spécifiques d'un Sigma sont retrouvés jusqu'à l'extrémité de la séquence inversée répétée TGTGTA. De même manière que
15 précédemment, tous les nucléotides hétérologues qui bordent le fragment SmaI-HinDIII utilisé pour la transformation sont délévés. Une nouvelle séquence chromosomique inconnue démarre au ras de la séquence Sigma::ARG4 intégralement préservée. De plus, à 16 pb en 5' du Sigma::ARG4 intégré, on observe une séquence correspondant à un ARNt
20 Ala.

Enfin, la séquence spécifique du Sigma présente deux caractéristiques importantes :

- à la position 343 on trouve le nucléotide G qui singularise le SIGMAVIII.1 (figure 3).
25 - aux positions 307 et 309, on trouve respectivement deux nucléotides A à la place des nucléotides C et G qui singularisent le SIGMAVIII.1, et qui étaient initialement présents dans la séquence du fragment SmaI-HinDIII utilisé pour la transformation.

Ces résultats démontrent que dans le transformant ORT723
30 l'intégration du fragment Sigma::ARG4 s'est produite par recombinaison homologue dans un Sigma chromosomique préexistant, comme dans le cas précédent. De ce fait, pour ORT723, il est possible de préciser que la recombinaison s'est probablement effectuée entre les nucléotides 309 et 343 des éléments Sigma impliqués.

EXEMPLE 9

Transformations séquentielles de la souche MGD131 102A

a) par le fragment Sigma::ARG4 puis par le fragment Sigma::URA3.

5 Les transformants ARG⁺ ura⁻ ORT720 et ORT723 obtenus et caractérisés dans l'exemple 8 sont transformés par électroporation par l'ADN du fragment ClaI (Sigma::URA3) purifié après digestion du plasmide pBK617.

10 Les transformants URA⁺ obtenus sont sélectionnés sur milieu sans uracile. Ces transformants URA⁺ ont gardé la faculté de croître sur milieu sans arginine.

15 L'analyse de 5 surtransformants ARG4⁺ URA3⁺ (désignés par ORT720.6, 720.7, 720.8 et ORT723.8, 723.9) choisis au hasard, est réalisée par séparation de chromosomes, transfert sur membrane de nylon et hybridation du filtre obtenu à l'aide des sondes spécifiques ARG4 et URA3 (figure 16).

20 Les surtransformants ORT720.6, 720.7 et 720.8 portent au chromosome IX le gène ARG4 comme la souche ORT720 dont ils dérivent. D'autre part, ces surtransformants portent le gène URA3 respectivement au chromosome XII, VIII et IV.

Par ailleurs, les surtransformants ORT723.8, 723.9 portent au chromosome II le gène ARG4 comme la souche ORT723 dont ils dérivent et le gène URA3, respectivement au chromosome VIII et XII.

25 b) par le fragment Sigma::URA3 puis par le fragment Sigma::ARG4

De manière symétrique, le transformant URA⁺ arg⁻ ORT740 obtenu et caractérisé à l'exemple 7 est transformé par électroporation avec l'ADN du fragment HindIII (Sigma::ARG4 de 2,4 kb) purifié après digestion du plasmide pBK615.

30 Les transformants ARG⁺ obtenus sont sélectionnés sur milieu sans arginine. Ces transformants ont conservé la faculté de croître sur milieu sans uracile.

L'analyse de 3 surtransformants URA⁺ ARG⁺ (désignés par ORT740.1, 740.2, 740.3) choisis au hasard, est réalisée par séparation de chromosomes, transfert sur membrane de nylon et hybridation du filtre obtenu à l'aide des sondes spécifiques ARG4 et URA3.

On constate que ces trois surtransformants portent le gène URA3 au chromosome VIII comme la souche ORT740 dont ils dérivent et le gène ARG4 respectivement au chromosome IX, IV et XII.

Il est donc possible de la sorte d'obtenir par le système d'intégration proposé selon l'invention la dispersion de différents types de séquences dans la même cellule, à des loci différents et variables.

EXEMPLE 10

Co-transformation de la souche de levure MGD131 102A par les fragments Sigma::ARG4 et Sigma::URA3

La souche MGD 131 102A arg4- Δ 2060 ura-52 est transformée par électroporation à l'aide d'un mélange d'ADN comportant :

- le fragment HindIII (Sigma::ARG4 de 2,4 kb) purifié après digestion du plasmide pBK615
- le fragment ClaI (Sigma::URA3 de 1,4 kb) issu de la restriction du plasmide pBK617.

Les transformants ARG⁺ sont sélectionnés sur milieu sans arginine et repiqués sur milieu sans uracile. De la sorte, on crible les co-transformants ARG⁺ URA⁺.

On effectue l'analyse de co-transformants ARG⁺ URA⁺ (désignés par ORT746, 747, 748, 749, 751, 752 et 753) par séparation de chromosomes, transfert sur membrane de nylon et hybridation du filtre obtenu à l'aide des sondes spécifiques URA3 et ARG4 (figure 18).

Il ressort de cette analyse que les gènes ARG4 et URA3 se retrouvent, dans chaque co-transformant, intégrés au même chromosome. Ce chromosome peut varier d'un co-transformant à l'autre. On trouve en effet les gènes ARG4 et URA3 au chromosome :

- XII pour ORT749
- IV pour ORT747
- XV ou VII pour ORT746, 748 et 753
- II pour ORT751
- XIV pour ORT752.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) J.B. Hicks, A. Hinnen and G.R. Fink: Properties of Yeast Transformation.
Cold Spring Harbor Symposium on Quant. Biol; 43, 1305-1313 (1978).
- 5 2) T.S. Lopes, J. Klotwijk, A.E. Veenstra, P.C. van der Aar, H. van
Heerikhuizen, H. A. Raué and R.J. Planta : High-copy-number
integration into the ribosomal DNA of S.cerevisiae : a new vector for
high-level expression ; Gene 79 : 199-206 (1989).
- 10 3) H.L. Klein: Recombination between Repeated Yeast Genes: p 355-422 in
The Recombination of Genetic Material, Brooks Low Editor, Acad. Press
(1988).
- 4) P.C. Van der Aar, T.S. Lopes, J. Klotwijk, P.H. Groeneveld, H.W. Van
Versereld and A.H. Stouthamer : Consequences of phosphoglycerate
kinase overproduct for the growth and physiology of S.cerevisiae ; Appl.
15 Microbiol. Biotechnol 32 : 577(587 (1990).
- 5) J.D. Boeke, D.J.Garfinkel, C.A. Styles and G.R. Fink:TY Elements
Transpose through an RNA Intermediate; Cell, 40: 491-500 (1985).
- 6) V.M. Williamson, E.T. Young and M. Ciriacy: Transposable Elements
Associated with Constitutive Expression of Alcohol Dehydrogenase; Cell,
20 23: 605-614 (1981).
- 7) D.T. Chaleff and G.R. Fink: Genetic Events Associated with an Insertion
Mutation in Yeast; Cell, 21: 227-237 (1980).
- 8) D. J. Clark, V.W. Bilanchone, L.J. Haywoods, S.L. Dildine and S.B.
Sandermeier: A Yeast Sigma Composite Element, TY3, has Properties of
25 a Retransposon; J.Bio.Chemist. 263: n°3, 1413-1423 (1988).
- 9) F.S. Genbauffe, E.C. Chisholm and T.G. Cooper: Tau, Sigma and Delta.
J.Bio.Chem. 259: 10518-10525 (1984).
- 10)A. Eigel and H. Feldann: Tyl and Delta Elements Occur Adjacent to
Several tRNA Genes in Yeast. EMBO J. 1: n°10, 1245-1250 (1982).
- 30 11)S.B. Sandmeyer, V.W. Bilanchone, D.J. Clark, P. Morcos, G.F. Carle and
G.M. Brodeur: Sigma Elements are Position-Specific for Many Different
Yeast tRNA Genes. Nucleic Acids Res. 10: 1499-1515 (1988).

- 12) H.T. Wang, S. Frackman, J.Kowalisyn, R.E. Esposito and R. Elder :
Developmental Regulation of SPO13, a Gene required for Separation of
Homologous Chromosomes at Meiosis. *Mol. Cell. Biol.* 7: n°4, 1425-1435
(1987).
- 5 13) M.L. Bach, F. Lacroute and D. Botstein : Evidence for transcriptional
regulation of orotidine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by
hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in
Escherichia coli *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:386-390 (1979).

REVENDECATIONS

1. Cassette d'intégration multisite dans le génome d'une levure, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins :

- 5 - une séquence d'intégration présentant de l'homologie avec une séquence "non essentielle" naturellement répétée et dispersée dans le génome de la levure,
 - une séquence d'intérêt.

10 2. Cassette d'intégration multisite selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite séquence d'intégration est une séquence présentant de l'homologie avec une séquence type Solo LTR d'une levure, notamment du genre Saccharomyces.

15 3. Cassette d'intégration multisite selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite séquence type Solo LTR est choisie parmi les Solo LTR de S. cerevisiae.

 4. Cassette d'intégration multisite selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite séquence type Solo LTR est la séquence Solo Sigma de S. cerevisiae.

20 5. Cassette d'intégration multisite selon la revendication 4, caractérisée en ce que ladite séquence Solo Sigma est la séquence Solo Sigma localisée sur le chromosome VIII de S. cerevisiae à proximité du gène ARG4.

 6. Cassette d'intégration multisite selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt est clonée à l'intérieur de ladite séquence d'intégration.

25 7. Souche de levure transformée par une cassette d'intégration multisite selon l'une des revendications précédentes.

 8. Souche de levure du genre Saccharomyces caractérisée en ce qu'elle contient dans son génome au moins une séquence d'intérêt intégrée en une seule copie dans au moins une séquence naturellement répétée et dispersée de son génome.

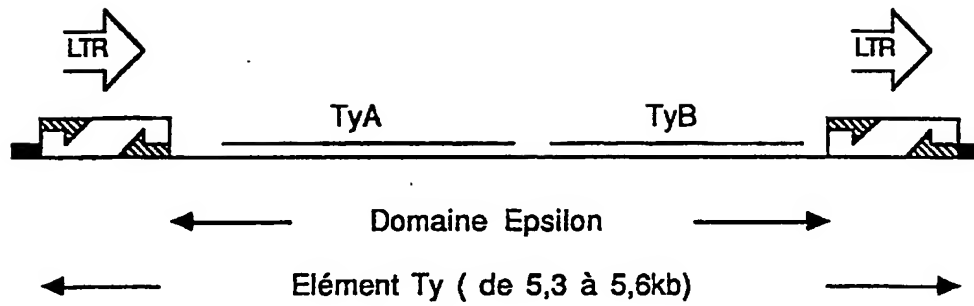
30 9. Souche de S.cerevisiae caractérisée en ce qu'elle contient dans son génome au moins une séquence d'intérêt intégrée dans au moins une séquence Solo Sigma.

10. Procédé de préparation d'un produit d'intérêt par une levure du genre Saccharomyces, selon lequel :


- on transforme une levure du genre Saccharomyces par une cassette d'intégration selon l'une des revendications 1 à 6,
- 5 - on met en culture la levure ainsi transformée, et
- on récupère le produit obtenu.

11. Procédé de préparation de plusieurs produits d'intérêt par une levure du genre Saccharomyces selon lequel :

- 10 - on transforme successivement une levure du genre Saccharomyces par une cassette d'intégration selon l'une des revendications 1 à 6, comportant chacune, en tant que séquence d'intérêt, une séquence d'ADN codant pour l'un des produits d'intérêt, ou
- on transforme une levure du genre Saccharomyces par une cassette d'intégration selon l'une des revendications 1 à 6, comportant plusieurs
- 15 séquences d'intérêt codant chacune pour l'un des produits d'intérêt, et
- on met en culture la levure ainsi transformée, et
- on récupère lesdits produits d'intérêt.



LTR : Long Terminal Repeat
 Delta pour Tyl et TyII (332 bp)
 Sigma pour TyIII (341 bp)

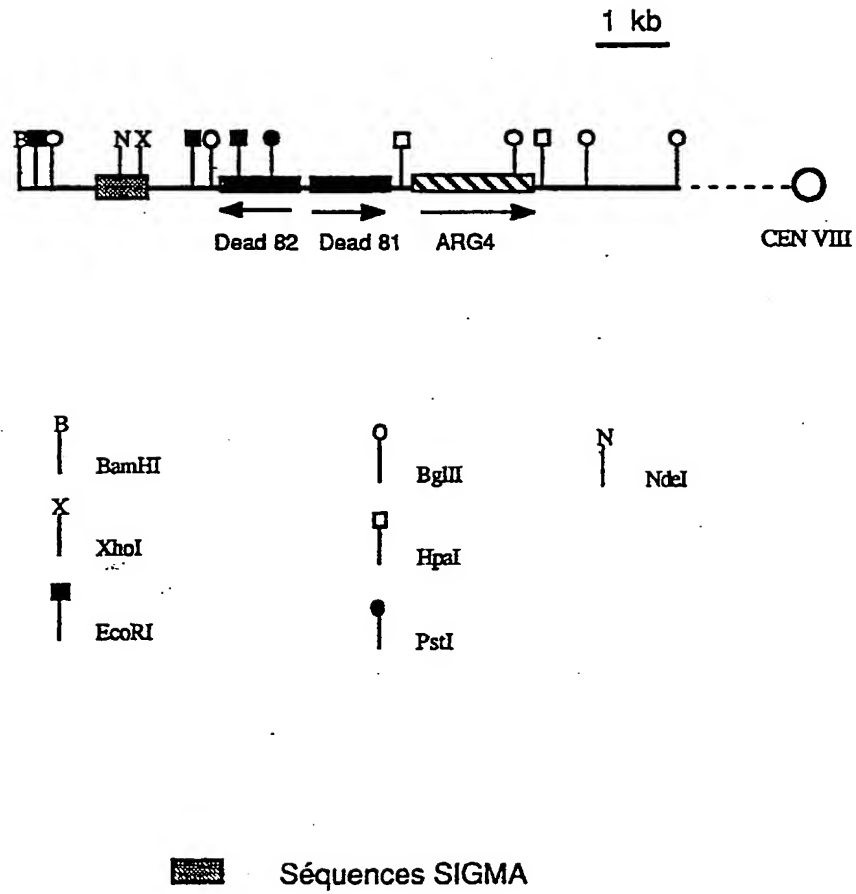
 : Internal Inverted Repeat (8' bp)

 Duplication de 5bp de la cible

TyA : Homologue du gène gag des rétrovirus

TyB : Homologue du gène pol des rétrovirus

FIG_1 :: Structure générale d'un Ty



FIG_2 : Carte physique du chromosome VIII dans la région du gène ARG4.

3 / 18

```

      *           *           *           *           50
TATAATTTTCATGTATAGAGTTTTTATTTTGTGCTTTTATCTTTCTAAA

      *           *           *           *           100
AATCAAATATCATCATCATTTTCAAATAATGTTTCCGCTATTAAATGTAC

      *           *           *           *           150
CTTACCATGTTGACAGCTTATACATTAACAGACCTTTATAGTACTGTTAT

      *           *           *           *           200
GGTAATAACAAAAAGATTGGACGAGTCCGGAATCGAACCGGAGACCTCT
      ↑
      *           *           *           *           250
CCCATGCTAAGGGAGCGCGCTACCGACTACGCCACACGCCCTGATATTTG
      ↓
      *           *           *           *           300
TTGAATGTGTTGTATTACGGGCTCGAGTAATACCGGAGTGCTTTGACAAT
      XhoI
      *           *           *           *           350
CCTAATCTGAACAGTCTTAGGGAAGTAACCAGTTGTCAAACGGTTTATC
      A A                               A
      *           *           *           *           400
AGATTAATTCACGGAATGTTACTTATCTTATATATTATATAAAATATGAA

      *           *           *           *           450
TCATACTAAGTGGTGGAAGCGCGGAATCTCGGATCTAAACTAATTGTTCA

      *           *           *           *           500
GGCATTTATACTTTTGGGTAGTTCAGCTAGGGAAGGACGGGTTTTGTCTC
      G -                               T
      *           *           *           *           550
ATGTTGTTTCGTTTGTGTTATAAGGTTGTTTCATATGTGTTTATGAACGTT
      *           *           *           *           600
TAGGATGACGTATTGTCATACTGACGTATCTCATTTTGAGATACAACAGA
      C G                               A
      *           *           *           *           633
ATGACTGGTATTAAAGAAATAAGGAATACCATA

```



Séquences inversées répétées du SIGMA



Séquences dupliquées de la cible d'intégration du TYIII.



Limites du gène codant pour l'ARNt Ala.



Localisation de l'anticodon AGC de l'ARNt.

Sous la séquence sont annotées les différences constatées avec la séquence SIGMA la plus fréquemment obtenue.

FIG. 3: Séquence nucléotidique de la région du chromosome VIII située à 4 kilobases en 5' du gène ARG4.

4 / 18

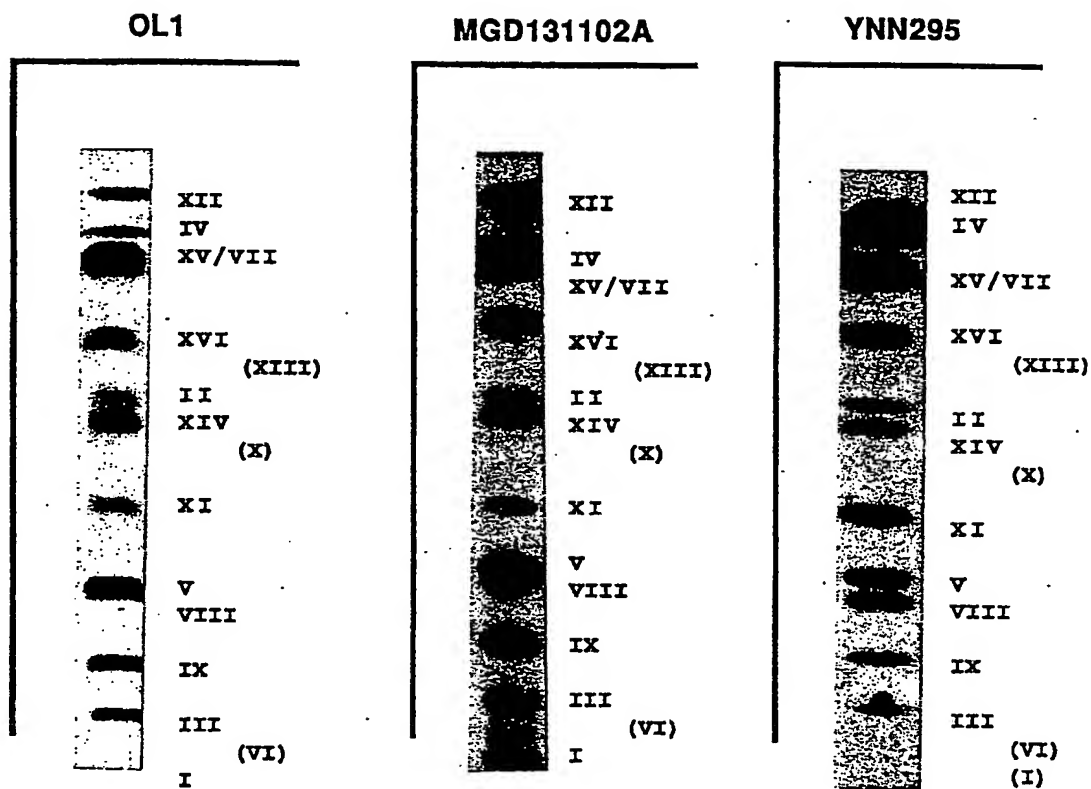


FIG. 4: Analyse par autoradiographie du contenu en éléments SIGMA des souches de *S. cerevisiae* OL1, MGD131 102A et YNN295.

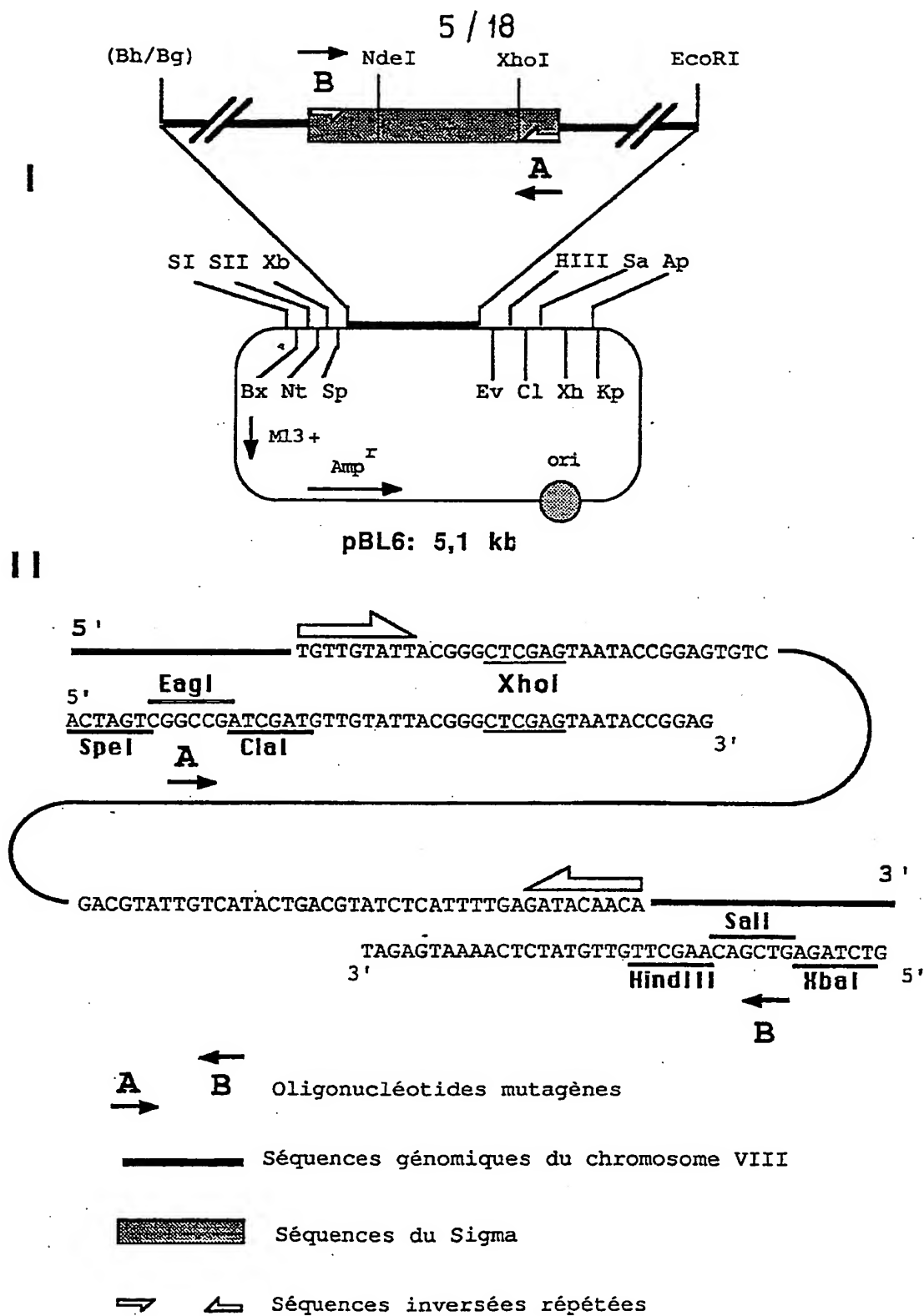
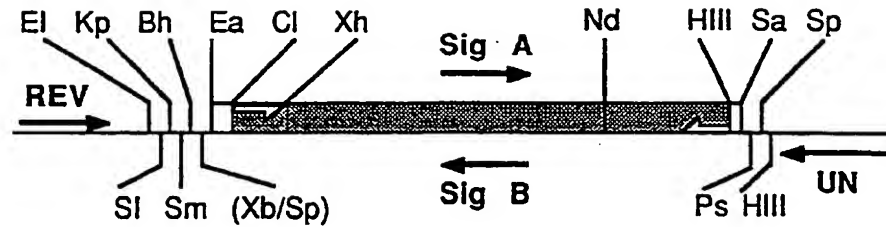


FIG.5: Mutagenèse par P.C.R des séquences latérales du SIGMAVIII.1

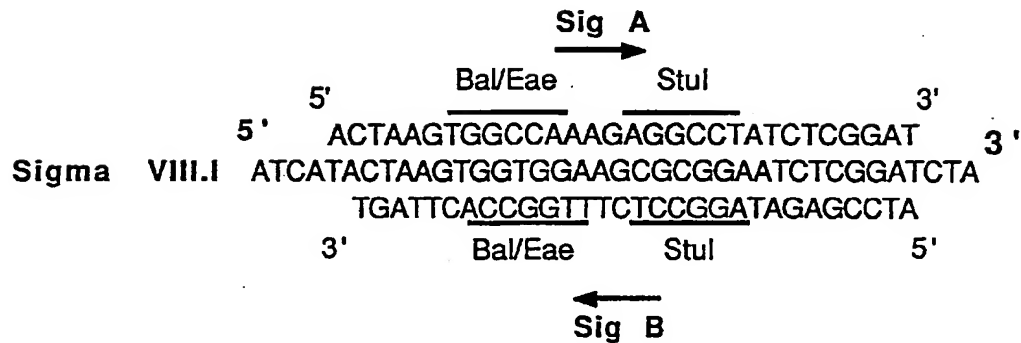
6 / 18

I



pBK605: 7,3kb

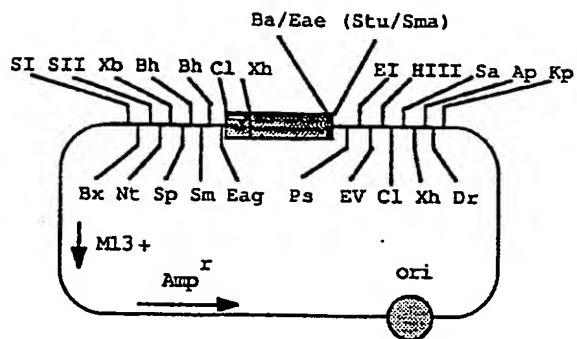
II



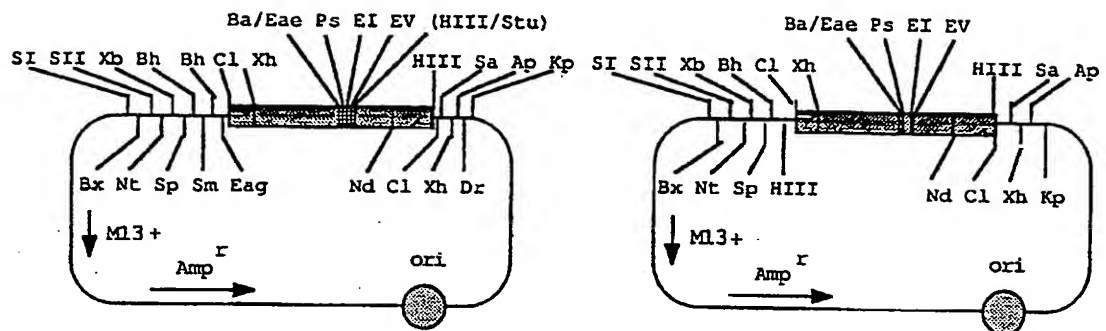
Détail des Oligonucléotides utilisés

FIG_6 : Mutagenèse par P.C.R des séquences centrales
du SIGMA VIII.1 cloné dans pBK605.

7 / 18



pBK609: 3,15 kb



pBK610: 3,3 kb

pBK614: 3,3 kb

Ap	ApaI	Bh	BamHI	Bg	BglII
Bx	BstXI	E	EcoRI	Ev	EcoRV
HIII	HinDIII	Hp	HpaI	Kp	KpnI
Nd	NdeI	Nt	Not/EagI	Sa	SalI
SI	SacI	SII	SacII	Sm	SmaI
Xb	XbaI	Xh	XhoI		



Séquences du sigma



Séquences inversées répétées

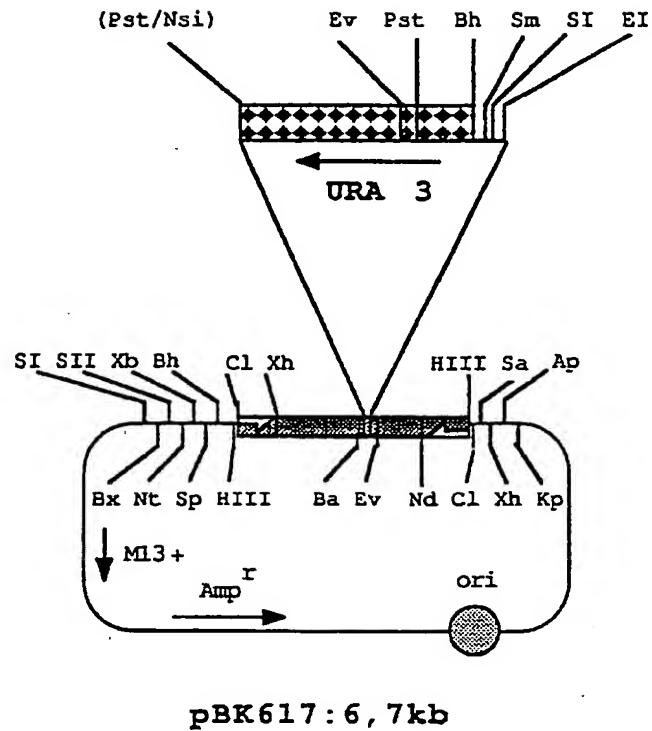
FIG. 7: Structure des plasmides
pK609, pBK610 et pBK614..

Cla I Xho I
 ATCGATGTTGTATTACGGGCTCGAGTAATACCGGAGTGTCTTGACAATCCTAATCTGAAC⁶⁰
 ██████████
 AGTCTTAGGGAAGTAACCAAGTTGTCAAAACGGTTTATCAGATTAATTCACGGAATGTTAC¹²⁰
 Bal/EaeI Pst I
 TTATCTTATATATTATATAAAATATGAATCATACTAAGTGGCCAAAGAGGGGGCTGCAGG¹⁸⁰
 EcoRV
 AATTCGATATCAAGCTCCTATCTCGGATCTAACTAATTGTTTCAGGCATTATACTTTTG²⁴⁰
EcoRI
 GGTAGTTCAGCTAGGGAAGGACGGCTTTTGTCTCATGTTGTTTCGTTTTGTTATAAGGTTG³⁰⁰
 TTTCATATGTGTTTTATGAACGTTTAGGATGACGTATTGTCATACTGACGTATCTCATT³⁶⁰
 HinDIII ³⁷⁷
 TGAGATACAACAAGCTT
 ██████████

██████████ Séquences inversées répétées du SIGMA.

FIG. 8 : Séquence nucléotidique du fragment ClaI-HinDIII
 du plasmide pBK610.

9 / 18



Ap	ApaI	Bh	BamHI	Bg	BglII
Bx	BstXI	E	EcoRI	Ev	EcoRV
HIII	HinDIII	Hp	HpaI	Kp	KpnI
Nd	NdeI	Nt	Not/EagI	Sa	SalI
SI	SacI	SII	SacII	Sm	SmaI
Xb	XbaI	Xh	XhoI		



Séquences du sigma



Séquences inversées répétées

FIG. 9 : Structure du plasmide pBK617.

10 / 18

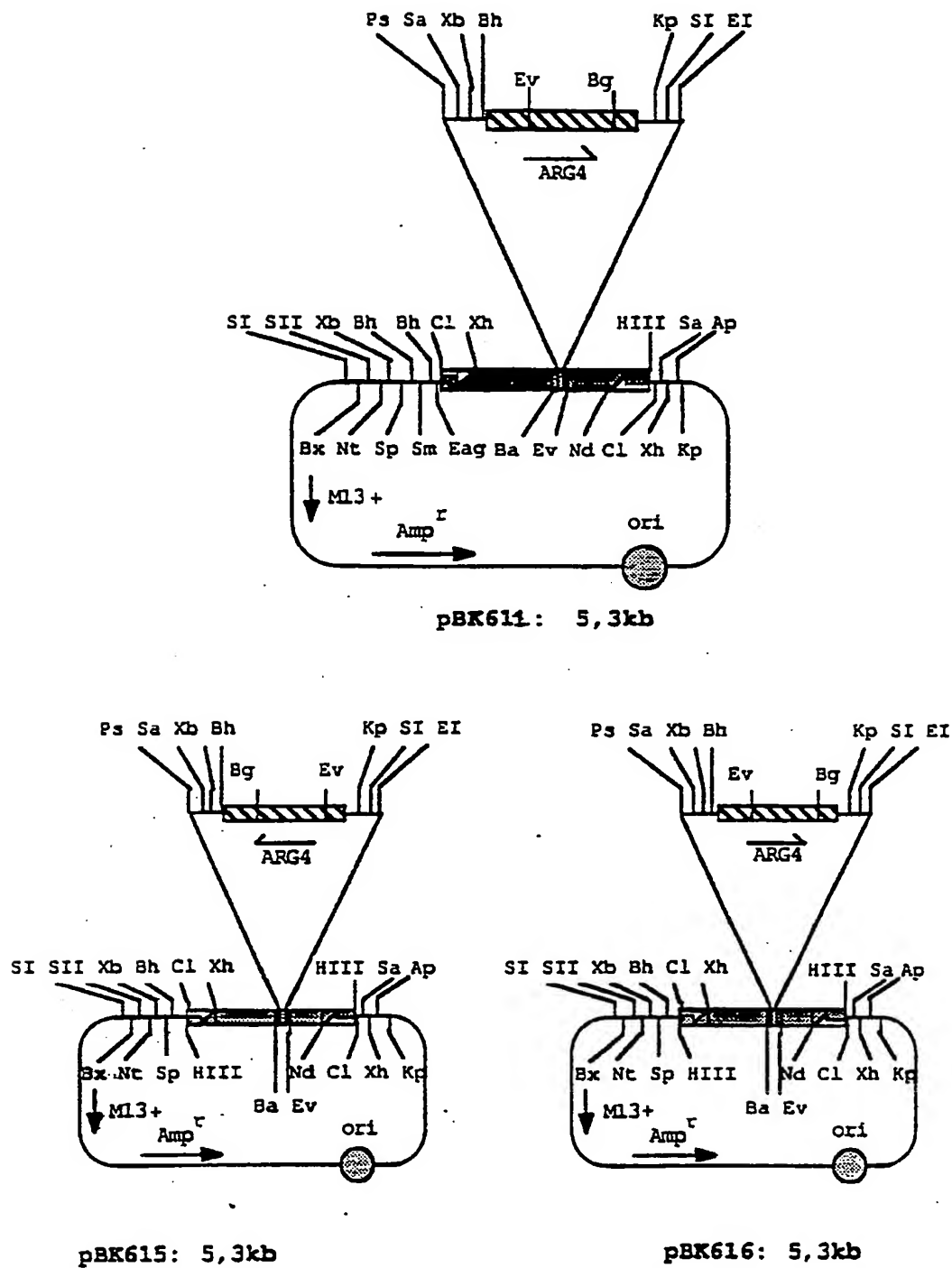


FIG. 10 : Structure des plasmides pBK611, 615 et 616

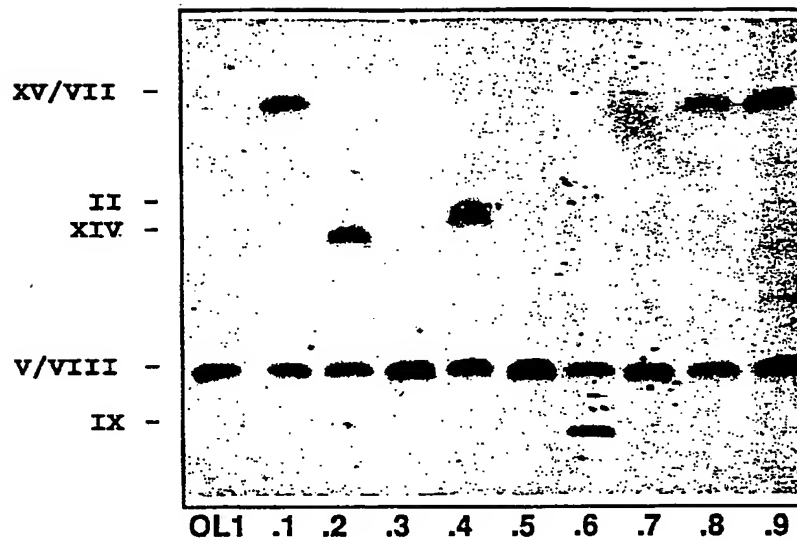


FIG.11 : Autoradiographie des chromosomes de la souche OL1 et des transformants ORT786.1 à ORT786.9 par une sonde spécifique URA3.

12 / 18

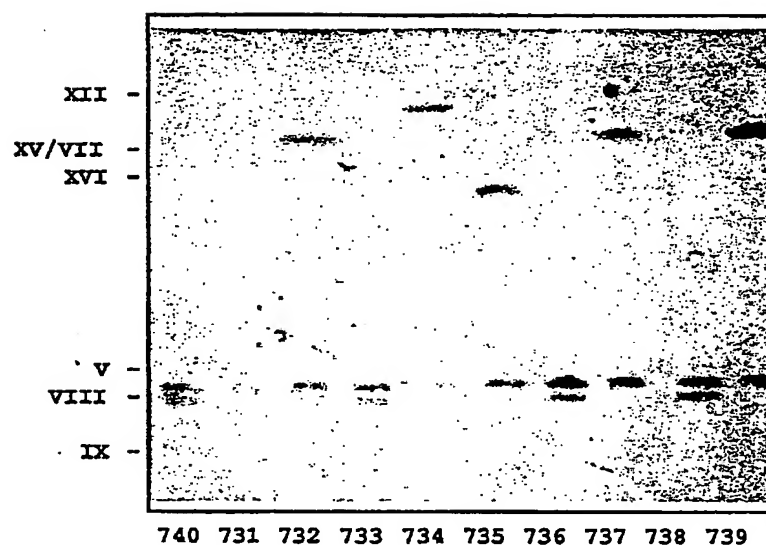
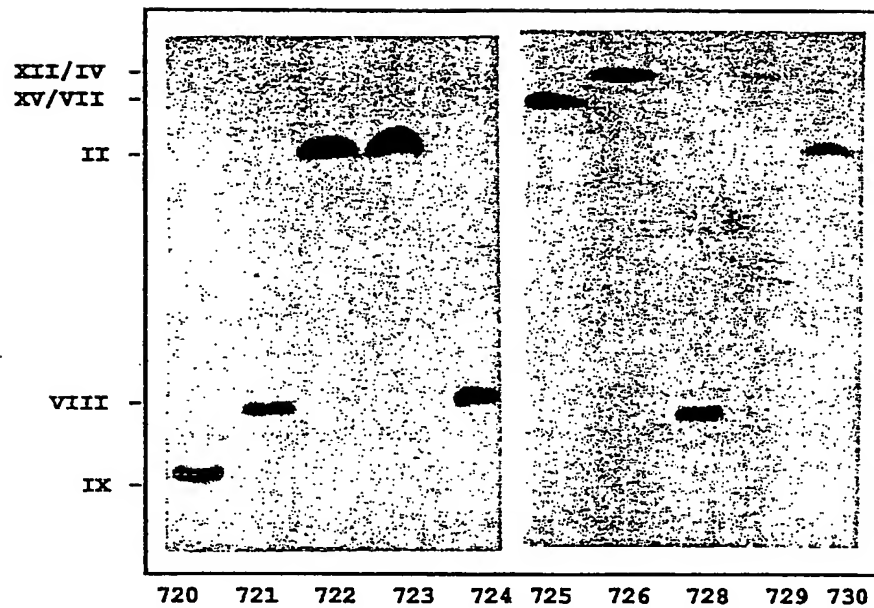


FIG. 12 : Analyse par autoradiographie des chromosomes des transformants URA⁺ ORT731 à ORT740 à l'aide d'une sonde spécifique URA3.



FIG_13 : Autoradiographie des chromosomes des transformants ARG+ ORT720 à ORT730 par une sonde spécifique ARG4.

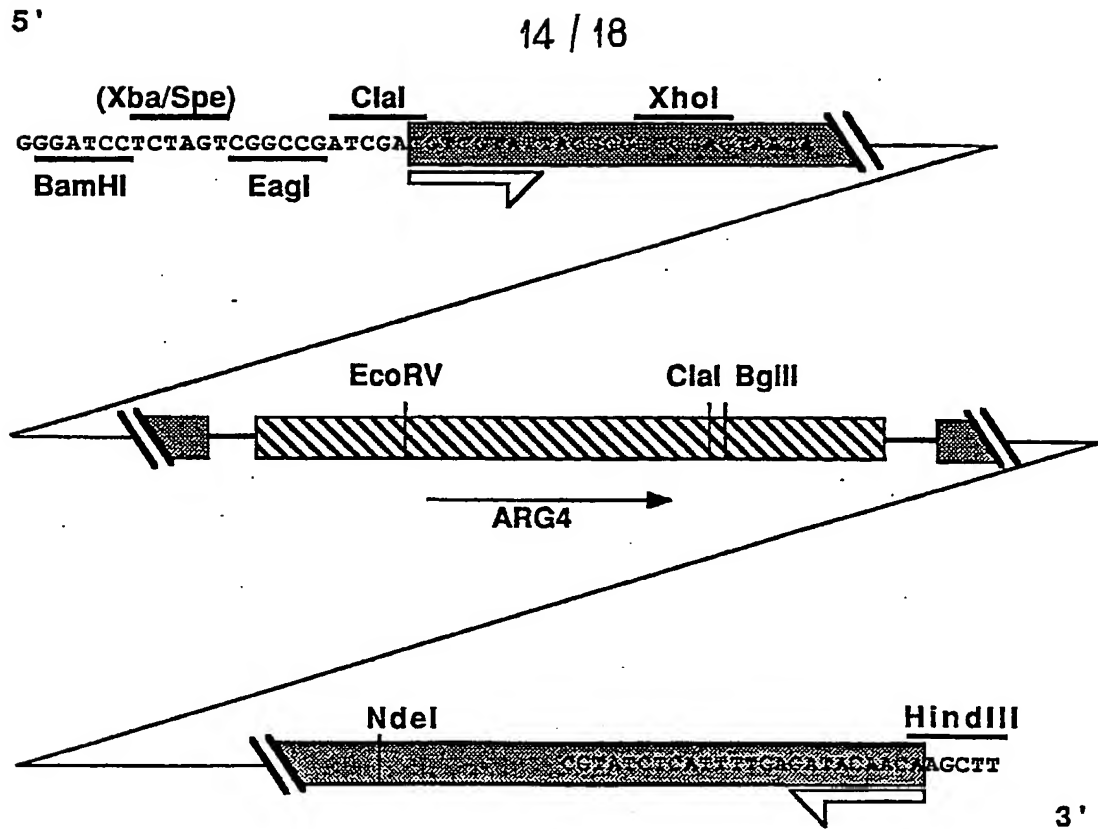


Fig.14 a)

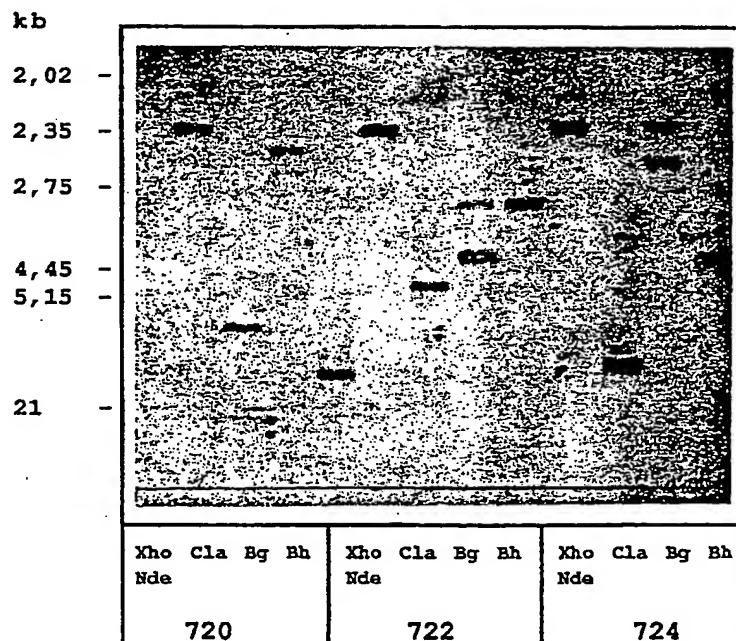
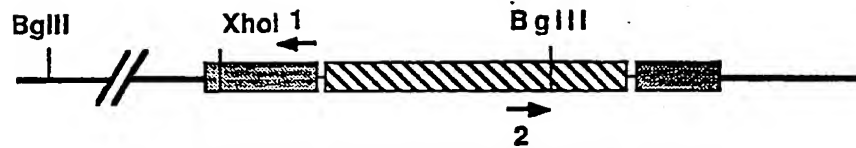


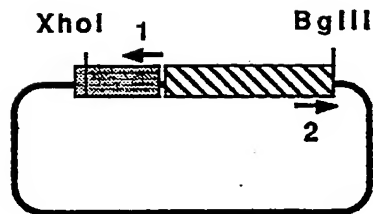
Fig. 14 b)

FIG.14: Structure et séquences bordantes du fragment SmaI-HindIII du pBK611. (fig. 14 a)
Analyse par Southern des transformants ORT720, ORT722 et ORT724. (fig. 14 b)

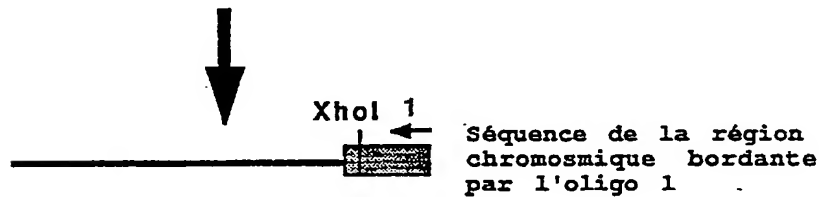
15 / 18



Restriction de l'ADN par BglIII
Dilution et Ligation



Dénaturation des brins
Hybridation avec les
oligonucléotides 1 et 2,
Amplification P.C.R



Séquence de la région
chromosmique bordante
par l'oligo 1

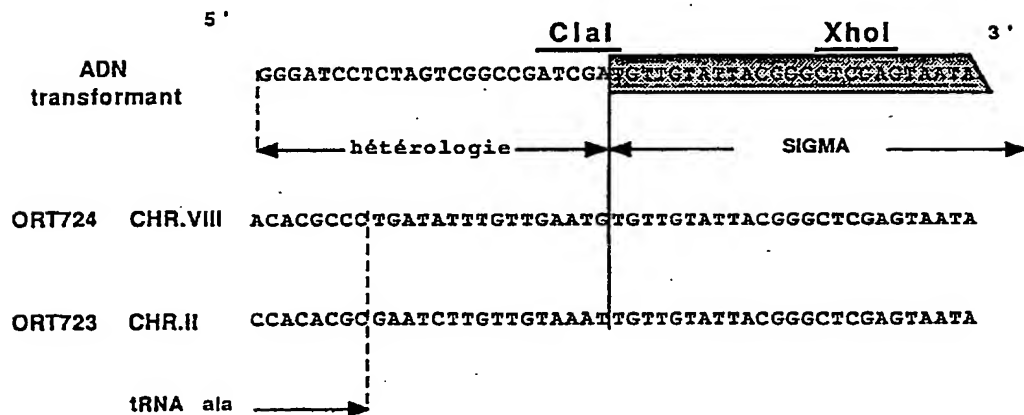


FIG.15 : Inverse P.C.R et Séquences génomiques des transformants ORT 723 et 724.

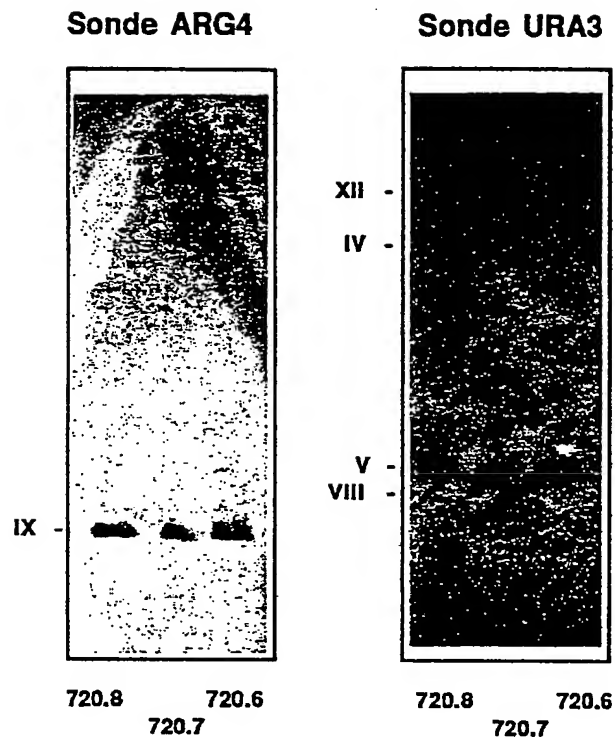
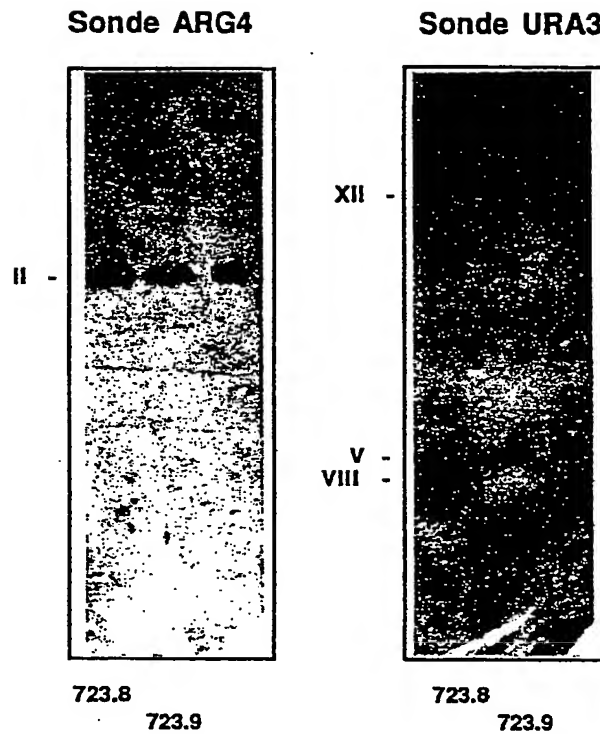


FIG.16 : Analyse par autoradiographie des chromosomes de différents surtransformants ARG⁺ URA⁺ à l'aide de sondes spécifiques ARG4 et URA3.

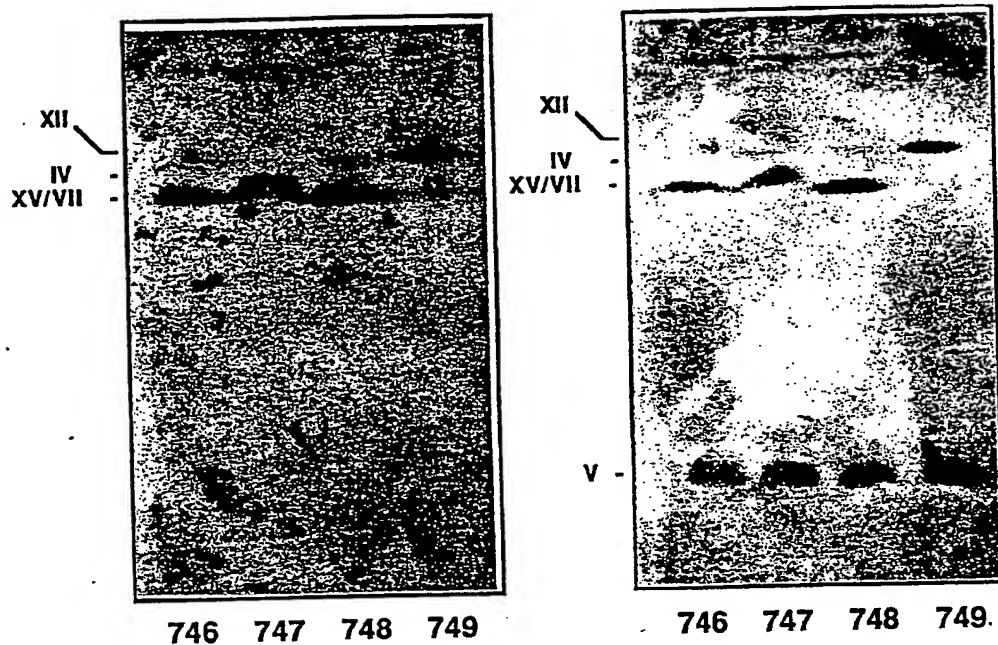


FIG_17 : Analyse par autoradiographie des chromosomes de différents surtransformants URA⁺ ARG⁺ à l'aide de sondes spécifiques URA3 et ARG4 .

Sonde ARG4

18 / 18

Sonde URA3



Sonde ARG4

Sonde URA3

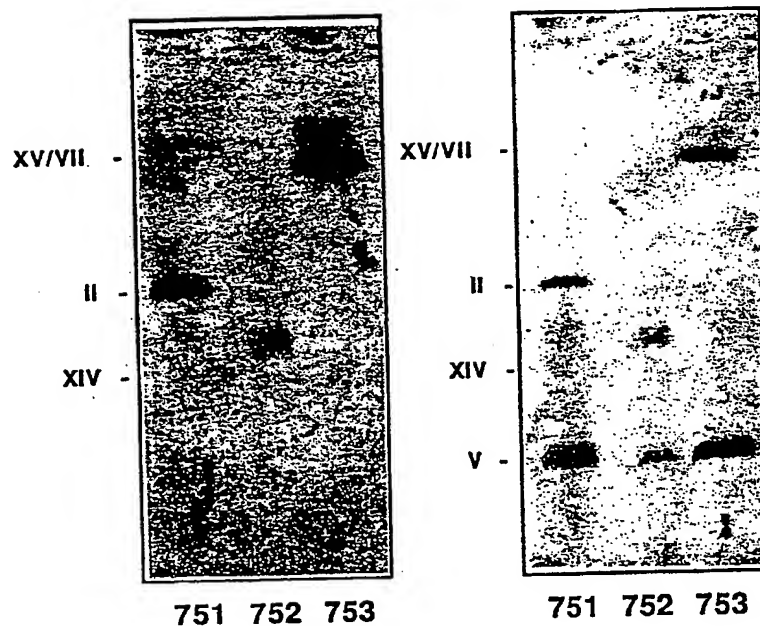


FIG.18 : Analyse par autoradiographie des chromosomes de différents co-transformants ARG⁺ URA⁺ à l'aide de sondes spécifiques ARG4 et URA3.

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2670502

N° d'enregistrement
national

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FR 9015602
FA 450686

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO-A-8 803 169 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) * Revendication 10 *	1-11	
X	EP-A-0 310 586 (SMITH KLINE - RIT SA) * Résumé *	1-11	
X	WO-A-9 005 787 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) * Revendication 1 *	1-11	
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 5, 1989, pages 1865-1866, Oxford, GB; F. CREUSOT et al.: "A novel tRNA Ala gene and its adjacent sigma element downstream from the CYPI (HAP1) gene in Saccharomyces cerevisiae"	5	
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 16, no. 4, 1988, pages 1499-1515, Oxford, GB; S.B. SANDMEYER et al.: "Sigma elements are position-specific for many different yeast tRNA genes"	2-4	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			C 12 N
Date d'achèvement de la recherche 09-07-1991			Examinateur VAN PUTTEN A.J.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 01.82 (P0412)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.